

A INFLUÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE A NEUROGÊNESE NO GIRO DENTEADO DE CAMUNDONGOS ALBINOS SUÍÇOS JOVENS

Sabrina Yuri Imada Minatelli

sabrina.minatelli@gmail.com

Trabalho de Conclusão de
Curso como requisito à
obtenção de grau de
Bacharel em Ciências
Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina.

Orientador: Dr. Giordano Gubert Viola

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Cilene Lino de Oliveira

Florianópolis, dezembro de 2012.

Minatelli, Sabrina Yuri Imada

A influência do enriquecimento ambiental sobre a neurogênese no giro denteado de camundongos albinos suíços jovens [TCC]. Sabrina Yuri Imada Minatelli; Orientador, Giordano Gubert Viola - Florianópolis, SC, 2012.

52 p.

Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Curso de Ciências Biológicas.

Sabrina Yuri Imada Minatelli

**A INFLUÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE A
NEUROGÊNESE NO GIRO DENTEADO DE CAMUNDONGOS
ALBINOS SUÍÇOS JOVENS.**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharela em Ciências Biológicas”, e aprovada em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 06 de dezembro de 2012.

Profa Dra Maria Risoleta F. Marques
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

BANCA EXAMINADORA

Dr. Giordano G. Viola
Presidente

Mestrando Cássio Loss
Examinador

Mestranda Fernanda Possamai
Examinadora

Doutorando Fernando Melleu
Examinador

"É do buscar e não do achar que nasce o que eu não conhecia."
Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

À minha família por sempre estarem ao meu lado. Principalmente ao meu pai por ter acreditado em mim e por ter aceitado minha decisão de voltar à Floripa. E também por ter me dado a oportunidade de fazer meu intercâmbio para a Itália.

Às minhas irmãs que sempre estão ao meu lado me animando, me fazendo rir com as nossas besteiras. À Luciana, minha irmã mais nova, que é uma fofa e companheira. À Micheli, irmã e grande amiga minha. E à Juliana por suas maluquices.

À minha mãe por ser tão atenciosa, cuidadosa e querida. Por ser a melhor mãe do mundo!

Ao Caetano, por ter tido tanta paciência (ou não!) comigo, por entender os meus estresses, por sempre estar comigo me apoiando, me dando dicas, me ajudando. Obrigada por seu tão companheiro e por cuidar de mim.

À Ane, por sua amizade e por me apoiar em tudo. E ao David por sempre estar ao meu lado em tudo.

Aos meus colegas da Bio. Mesmo que a gente não se forme todos juntos, foi um prazer ter estudado e conhecido vocês! À Thais Gabriela, Bianca, Dayse, Juliano, Tammy, Gabriel... E à Lais por ter me aguentado 6 meses na Itália e por ser uma boa amiga.

À Fernanda Possamai por ter aceitado meu convite para ser minha banca. Obrigada por disponibilizar seu tempo para corrigir meu trabalho e também por ter me ajudado no laboratório e por ter me ensinado várias coisas com os animais.

Ao Cássio Loss por aceitar ser minha banca, por vir de PoA para isso. E obrigada com a ajuda.

Ao Fernando Melleu por ter aceitado ser a minha banca, mesmo que suplente, e também pela grande ajuda no laboratório, com a imunoistoquímica!

À todos os meus professores da graduação.

Ao André Báfica, meu primeiro orientador do meu primeiro laboratório na UFSC.

À Cilene por ter me recebido em seu laboratório, por ter me aceito como monitória, por ter tido paciência comigo em alguns momentos e por querer o melhor para mim (agora reconheço isso). Agradecimento também por ter me ajudado a escolher o tema do presente trabalho e ter financiado as despesas das imunoistoquímicas com recursos da Fapesc (Jovem Investigador) e da Fundação Alexander Von Humboldt (Equipment Grants).

Ao Giordano por ter aceitado assim tão em cima da hora em me orientar, ainda mais numa área que eu nunca tive contato. Muito obrigada pela atenção, por me ensinar várias coisas, por ter me acompanhado na Fesbe, enfim, posso dizer que fostes realmente um orientador. Agradecimento também por ter financiado as despesas com os experimentos comportamentais com recursos da PRODOC-CAPES.

E às agências financiadoras pela concessão das bolsas de IC (CNPq) e de monitoria (UFSC).

RESUMO

O enriquecimento ambiental (EA) ou também ambiente enriquecido (AE) é a modificação do ambiente padrão em que o animal é criado em cativeiro. Através da adição de variados elementos que não existem em ambiente padrão, este ambiente pode aumentar a qualidade de vida dos animais, podendo-se dizer que este ambiente é a reprodução de um ambiente complexo e interativo, próximo do encontrado na natureza. O EA é um modelo experimental para estudar eventos relacionados a neuroplasticidade, pois aumenta a neurogênese, a sobrevivência neuronal, os níveis de neurotrofinas e mudanças na arborização dendrítica dos neurônios de diversas regiões do encéfalo. O objetivo deste trabalho é de avaliar os efeitos quanto ao nível neurogênese em camundongos suíços machos criados em AE por nove semanas. Dez camundongos suíços machos foram criados em ambiente enriquecido dos quais cinco foram utilizados na imunorreação para Doublecortina (DCX) e imunorreação para o anticorpo Ki67 e posterior contagem de células positivas. Outros 10 animais foram criados como grupo controle em uma caixa-padrão, dos quais cinco, foram utilizados na imunorreação para Doublecortina (DCX) e na imunorreação para o anticorpo Ki67. Os resultados mostraram que a mudança de ambiente não aumentou a neurogênese no giro denteado. Apesar de destoar dos dados obtidos em outras cepas de camundongos, estes dados são semelhantes a outros previamente obtidos no camundongo Suíço. Com isso, acredita-se que o fator que melhor explica este resultado está ligado à linhagem utilizada no trabalho.

Palavras-chave: Ambiente enriquecido, neurogênese, giro denteado, camundongos suíços.

ABSTRACT

Environmental enrichment (EE) is an experimental procedure that allows the study of neuroplastic events such as increase in neurogenesis, neuronal survival, increase in the levels of neurotrophic factors, changes in dendritic branching of neurons and morphology of astrocytes. Protocols of EE promote an increase in physical activity, learning experiences, visual inputs, social interactions and theoretically increase the quality of life in captive animals. Our study was designed to evaluate changes in neurogenesis in the dentate gyrus of male Swiss mice housed in EE for 9 weeks from weaning. No significant changes in the number of cells expressing Doublecortin—(DCX, a protein typical of immature neurons), or in the number of cells expressing DCX arranged in clusters, or in the number of nuclei expressing the protein Ki67 (a protein typical of proliferating cells) was observed. These findings are similar to those of previous studies and corroborate the idea that EE does not affect hippocampal neurogenesis of male albino Swiss mice.

Keywords: Environment enriched, neurogenesis, dentate gyrus, mice Swiss albino.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do hipocampo, mostrando as regiões hipocâmpais e a circuitaria hipocâmpal. O giro denteado está representado como um traço em vermelho com seus neurônios em preto. As fibras musgosas representado como um traço fino vermelho, fazendo sinapse com os neurônios da região CA3 (em vermelho) e as colaterais de Schaffer, em azul que saem de CA3 fazendo contato com dendritos localizados no Stratum Radiatum da região CA1.

Figura 2: Regiões de ocorrência de neurogênese no encéfalo adulto de roedores. SVZ – zona subventricular (ZSV). RMS – corrente migratória rostral. ZSG – zona subgranular. Adaptado de Lichtenwalner & Parent JCBFM, 2006.

Figura 3: Tipos de alojamento. A) gaiola utilizada para o ambiente enriquecido e B) caixa utilizada para o ambiente padrão. (AMARAL et al., 2008)

Figura 4: Em A) fotografia de células individualizadas; B) fotografia de Cluster. Marcação de DCX, 200x; C) fotografia de células individualizadas marcadas com Ki-67.

Figura 5: Gráfico obtido após contagem de células individuais marcadas com DCX+, onde animais do ambiente padrão estão representados pela barra branca e animais do AE estão representados pela barra preta. Resultado expresso em mediana \pm intervalo interquartil. Não ocorre diferença estatística entre os grupos ($p=0,06$).

Figura 6: Gráfico obtido após a contagem dos agrupamentos de células DCX+ que não podiam ser individualizadas. Ambiente padrão está representado com a barra branca e o AE com a barra preta. Resultado expresso em mediana \pm intervalo interquartil. Não ocorre diferença estatística entre os grupos ($p=0,44$).

Figura 7: Gráfico representativo da contagem de Ki-67+ em relação ao ambiente padrão (em branco) e AE (em preto). Resultado expresso em mediana \pm intervalo interquartil. Não ocorre diferença estatística entre os grupos ($p=0,17$).

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Ambiente enriquecido	13
1.2. Hipocampo	18
1.3. Neurogênese	22
2. OBJETIVOS	26
3. ESTRATÉGIA DE AÇÃO	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Obtenção dos animais e condições de alojamento	27
4.2. Ambiente enriquecido	28
4.3. Eutanásia	28
4.4. Microtomia	28
4.5. Imunoistoquímica para os marcadores de novos neurônios e células em proliferação	29
4.6. Diafanização das lâminas	30
4.7. Microscopia	31
4.8. Contagem de células	31
4.9. Análise estatística	32
5. RESULTADOS	33
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO	40
7. PERSPECTIVAS	40
REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ambiente enriquecido

O ambiente consiste em todos aqueles fatores e fenômenos externos ao organismo que influenciam sobre ele, quer se trate de fatores físicos ou químicos (abióticos) ou de outros organismos (bióticos) (BEGON et al., 2008).

Em alguns ambientes artificiais como jaulas em zoológicos, caixas-padrão em biotérios, os animais criados em cativeiro possuem várias restrições quanto a espaço, modo de alimentação, interações sociais e desafios. Já o ambiente enriquecido (AE) é a modificação do local em que vive um animal em cativeiro, através da adição de objetos que possam despertar interesse do animal, uma ampliação deste local, proporcionando assim aos indivíduos a oportunidade de realizar comportamentos mais propícios a espécie (NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006; CARVALHO et al., 2009). Nestes ambientes os animais têm a possibilidade da prática de atividade física e de aumento da interação social (GHIDINI, 2010). Portanto, enriquecimento ambiental é a reprodução de um ambiente complexo e interativo, que podem promover desafios e novidades, assim como em situações que ocorreriam normalmente no ambiente natural (ALMEIDA et al., 2008). Portanto, em laboratório este ambiente mais elaborado difere muito do “ambiente padrão”, em que os animais são criados dentro de caixas padronizadas, com um espaço também padronizado, onde é oferecido somente o alimento e água.

O ambiente padrão pode ser encontrado tanto em biotérios de laboratórios, zoológicos (jaulas padronizadas), mas também em criadouros de animais para abate (KIEFER et al., 2009). Em biotérios os animais são criados para diversos tipos de experimentos, estes animais ficam alojados em caixas padronizadas, onde o ambiente externo à caixa é controlado (DAMY et al., 2010). Em zoológicos os animais são criados em jaulas com a finalidade de visitação e observa o, mas muitas vezes não são oferecidos estímulos necessários para diminuir o tempo ocioso, o que gera alterações comportamentais (JAMAL & HUFFMAN, 2008), além de doenças como

estresse e obesidade. Já os animais criados para abate são mantidos muitas vezes em regime de confinamento intensivo onde um grande número de animais é criado em galpões. No caso destes animais para abate, muitos sofrem consequências fisiológicas e comportamentais (SILVA et al., 2002; SILVA et al., 2003) causadas pelo espaço reduzido, pelo tipo de alimento, pela foto-periodicidade (como na criação de frangos). Estes animais apresentam algumas deficiências como fragilidade dos membros, baixa imunidade, alterações circadianas (DAMY et al., 2010), entre outros. Sendo assim, uma série de pesquisadores argumenta que o ambiente enriquecido é uma aproximação de ambientes naturais o que fornece um maior bem estar aos animais (OLIVARES & SANTOS, 2012).

Adicionalmente, uma gama de pesquisadores propõe que o AE é um terceiro ambiente, diferente tanto do ambiente natural quanto do ambiente padrão. No ambiente natural o animal está sujeito às variações inesperadas do meio, ao intemperismo, à ação de predadores, falta de recurso, às interações intra e interespecíficas, de modo geral, não se pode prever as situações que os animais vão vivenciar (GUANDOLINI, 2009). Já o ambiente padronizado vários aspectos podem ser controlados, como quantidade de comida, água, temperatura, umidade, qualidade do ar, a quantidade, a periodicidade e a intensidade da luz, assim como as interações intra e interespecíficas, entre outros (DAMY et al., 2010). Portanto, segundo estes autores o AE pode ser considerado um terceiro ambiente, se assemelhando ao natural por proporcionar a possibilidade do aumento de interações entre os animais e dos animais com o meio, porém pode-se controlar, alimentação, foto-período, etc, assim como no ambiente padrão.

O ambiente enriquecido tem sido utilizado de forma crescente em muitos zoológicos e locais que mantém animais em cativeiro (ALMEIDA et al., 2008) além de ser utilizado em modelos experimentais de laboratório (BARONCELLI et al., 2008; DAMY et al., 2010), demonstrando uma maior preocupação com a qualidade de vida dos animais criados em cativeiro, assim aumentando a taxa de sobrevivência e reprodução de várias espécies (MUHLE & BICCA-MARQUES, 2008; PIZZUTTO et al., 2009). O AE também auxilia na diminuição do estresse em cativeiro com diminuição dos movimentos estereotipados (TURNER & LEWIS, 2003; WOLFER et al., 2004; MENDONÇA-FURTADO, 2006; SGAI, 2007; VIOLA et al., 2010;), auto-

mutilação, agressividade, (ALMEIDA et al., 2008) e de comportamentos considerados anormais (NASCIMENTO, 2010), peso dos animais, entre outros fatores.

O AE pode ser utilizado em ambientes de cativeiro para todos os grupos de animais (NASCIMENTO, 2010). Segundo o trabalho de Bloomsmith e col. (1991), foram identificados cinco principais tipos de enriquecimento, a) enriquecimento social, b) enriquecimento cognitivo, c) enriquecimento físico, d) enriquecimento sensorial e e) enriquecimento nutricional. Enriquecimento social é um ambiente onde se cria a oportunidade de interação entre os animais, tanto uma interação intraespecífica quanto uma interespecífica (NASCIMENTO, 2010). Através do enriquecimento cognitivo o animal pode ser estimulado pela troca dos objetos e pela troca de local dos objetos para então estimular as suas capacidades cognitivas. O enriquecimento físico consiste na mudança da estrutura física propriamente dita em que alguns objetos deixam o ambiente mais próximo do hábitat natural. O enriquecimento sensorial estimula os vários sentidos dos animais, como a área visual, olfativo, tátil, gustativo e auditivo, como por exemplo, a utilização de música clássica (CRUZ et al., 2010). E o enriquecimento nutricional consiste numa variação no tipo de entrega, como horário da alimentação, frequência, a forma que o alimento é oferecido, e também em relação ao tipo, como a variedade do alimento e a forma apresentação do alimento mesmo (BLOOMSMITH et al., 1991; NASCIMENTO, 2010).

Em animais de laboratório é bem observado que o AE gera alterações comportamentais. Entretanto estas alterações variam conforme as espécies, entre as linhagens utilizadas e até mesmo em relação a distintas tarefas utilizadas (NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006). Abramov e col. (2008) sugerem que o EA exacerba as características entre as espécies e entre as linhagens (ABRAMOV et al., 2008). Sendo assim, pode-se perceber uma discrepância nos resultados obtidos em tarefas comportamentais, podendo ser explicado pelo fato do AE acentuar as características comportamentais intrínsecas a cada espécie e de suas diferentes linhagens (ABRAMOV et al., 2008; VIOLA et al., 2010). Estas diferentes respostas entre as espécies e linhagens podem ocorrer em tarefas comportamentais como o labirinto aquático (ABRAMOV et al., 2008), o reconhecimento de objetos (BRUEL-JUNGGERMAN et al., 2005; VIOLA et al., 2010), o campo aberto (AMARAL et al., 2008), entre outros.

Essas diferenças podem ocorrer nas mais variadas linhagens e espécies, tanto quanto em tarefas comportamentais como em alterações morfológicas. No trabalho de Monteiro (2012) foram utilizados camundongos suíços machos e camundongos da linhagem C57BL/6J em testes de memória a adição de um animal intruso na gaiola após sete dias de isolamento social. Este resultou em uma diferença entre as duas linhagens, em que os suíços não são capazes de recordar do animal intruso após 24hs (memória de longa duração) (GUSMÃO & MONTEIRO et al., 2012; MONTEIRO, 2012). Entretanto animais da linhagem C57BL/6J são capazes de reter memória social após 24hs (MONTEIRO, 2012). Camundongos suíços criados em AE apresentam gênese astrocitária no giro denteado (GD) (DINIZ et al., 2010). Por outro lado, demonstrou-se que camundongos CF1 albinos criados em AE apresentam modificações na plasticidade do SNC, em relação à morfologia dos astrócitos, no entanto não ocorre aumento na imunoreatividade para GFAP ou no número de astrócitos de na região CA1 (VIOLA et al., 2009). Adicionalmente animais desta linhagem apresentam uma diminuição na exploração dos objetos na tarefa de reconhecimento de objetos (VIOLA et al., 2010) e uma habituação mais rápida ao campo aberto (AMARAL et al., 2008). Em um trabalho de Schaefers (2012) comparando linhagens de camundongos: CD1, C57BL/6 e descendentes de camundongos selvagens capturados foi mostrado que camundongos das duas linhagens CD1 e C57BL/6 submetidos à privação social seguida de atividade física apresentaram um aumento nas taxas de proliferação celular e uma maior sobrevivência de novos neurônios. Já os camundongos selvagens não tiveram diferença na proliferação em relação às condições de criação e nem no desafio da roda de correr (SCHAEFERS, 2012).

Em comparação com animais que vivem em condições padrão, os animais mantidos em AE apresentam aumento no peso do encéfalo e aumento de espessura do córtex cerebral (DIAMOND et al., 1964; SILVA, 2007). Este aumento na espessura cortical pode ocorrer devido a inúmeros fatores, como o aumento do número e comprimento dos dendritos, aumento do tamanho do soma neuronal e número de espinhas dendríticas (DIAMOND et al., 1964). Animais criados em cativeiro em ambiente padrão podem apresentar encéfalos entre 8 a 33% menores quando comparados com animais selvagens (KRUSKA, 1988; BURNS et al., 2009). Esta diminuição (principalmente do telencéfalo) é atribuída às diferenças genéticas geradas pela seleção

artificial, visto que a condição de cativeiro diminui a seleção sexual, gerando efeito em várias características, por exemplo: aumentando da docilidade e alterando das taxas de reprodução (BURNS et al., 2009). Com o AE, o animal recebe estímulos e com isso há um aumento de seu telencéfalo (DIAMOND et al., 1964), o que o torna mais próximo do animal selvagem, pois diminui os comportamentos estereotipados e melhora as habilidades comportamentais intrínsecas a espécie (BURNS et al., 2009, VIOLA et al., 2010). Adicionalmente, estudos demonstram que o AE induz mudanças neuroquímicas, morfológicas, funcionais, um aumento da neurogênese (HICKS et al., 2007), da sinaptogênese (DUFFY et al., 2001) que podem estar relacionadas com o melhor desempenho em tarefas cognitivas (VAN PRAAG et al., 2000; VIOLA et al., 2010; GHIDINI, 2010) e na atividade exploratória de roedores.

Após um período de estimulação em AE ocorre um aumento dos níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo) no hipocampo dos animais alojados em AE em comparação com animais em condições padrão (GOBBO & O'MARA, 2004; SILVA, 2007). O BDNF tem sido considerado um importante fator relacionado à neuroplasticidade do AE, assim como tendo uma relação com a neurogênese hipocampal (ROSSI et al., 2006). O BDNF auxilia no controle das vias de sinalização intra e intercelular que formam os circuitos neuronais durante o desenvolvimento e regula o crescimento axonal, a plasticidade, a sobrevivência neuronal e a neurotransmissão no encéfalo adulto (MATTSON et al., 2004; SILVA, 2007). No entanto, alguns trabalhos não apontam diferenças nos níveis de BDNF no hipocampo de animais criados em AE (VIOLA et al., 2010). Demonstrando mais uma vez as diferentes respostas entre: linhagens, animais ou mesmo as diferenças nos protocolos de AE escolhidos para experimentação.

Adicionalmente, estudos demonstram que na região CA1 do hipocampo (Figura 1) de ratos criados em AE apresentaram um aumento no número de sinapses e na densidade de espinhos dendríticos (MOSER et al., 1994; NITHIANANTHARAJAH et al., 2004; MARCUZZO, 2006). Além desta região, foi verificado na região CA3 um aumento no comprimento total dos espinhos dendríticos, no número de sinapses, no número de ramos dendríticos e aumento no número de espinhos dendríticos nos neurônios piramidais em ratos submetidos ao AE (MOSER et al., 1994; MARCUZZO, 2006). O

ambiente também aumentou a complexidade e o comprimento dendrítico dos neurônios piramidais do córtex motor, mostrando com isso que o enriquecimento ambiental gera um aumento na ramificação dendrítica, pois se acredita que a maior quantidade de informação e de ações às quais os animais são submetidos pode gerar uma maior demanda sináptica nos neurônios das regiões que participam do processamento neural dos estímulos obtidos através do AE (MARCUIZZO, 2006). Estudos sobre mudanças sinápticas envolvem cada vez mais o entendimento sobre sinapse tripartida (ARAQUE & PARPURA, 1999). Sendo assim, observou-se que o AE também influencia em mudanças que ocorrem em astrócitos. Tais como, mudança de um formato fusiforme normalmente encontrado na região CA1 para um formato estrelado, adicionalmente também é observado um aumento de processos originários do soma e aumento no comprimento dos processos no eixo lateral em camundongos CF1 machos (VIOLA et al., 2009). Assim como a gênese de astrócitos no giro denteado de camundongos suíços (DINIZ et al., 2010).

Sabendo-se de todas estas modificações que o ambiente pode causar no encéfalo dos animais, o AE além de ser muito utilizado para bem estar animal, principalmente tem sido utilizado por ser um modelo que oferece vários elementos que aumentam a neurogênese em animais de cativeiro, no caso de biotérios. Ele estimula essencialmente algumas regiões do encéfalo quanto à gênese de novos neurônios e no presente trabalho foi utilizado com a finalidade de se analisar a neurogênese hipocampal.

1.2. Hipocampo

Hipocampo vem de uma denominação grega que significa *hippos* = cavalo, *kampi* = curva. Possui este nome devido o seu formato curvado apresentado em secções coronais do encéfalo humano, se assemelhando a um cavalo-marinho (TAVARES, 2006; RIBAS, 2006; CARDOSO, 2010). O hipocampo é uma das principais estruturas do telencéfalo dos vertebrados, sendo um dos componentes do sistema límbico (CARDOSO, 2010). Nos mamíferos há a presença de dois hipocampus, um em cada hemisfério do encéfalo. O hipocampo está intimamente associado com o córtex cerebral e nos primatas está

localizado no lóbulo temporal medial, debaixo da superfície cortical (ISOLAN et al., 2007). Sendo que funcionalmente o hipocampo é considerado uma área importante em processos relacionados com o processo de formação, consolidação e recordação da memória (ROSSATO et al., 2007). Atualmente pesquisadores dividem o hipocampo de roedores em duas regiões funcionalmente distintas, a porção ventral que está associada principalmente com a ansiedade e a porção dorsal que está associada com a navegação espacial (HAWLEY et al., 2012).

No Alzheimer, o hipocampo é uma das regiões do encéfalo a sofrer danos, que podem ser vistos através de sintomas como a desorientação e problemas de memória (ENGELHARDT et al., 2001). Danos ao hipocampo também podem ser ocasionados por falta de oxigênio (hipóxia), encefalite ou epilepsia do lobo temporal medial. Pessoas com extensa lesão bilateral do hipocampo podem ter amnésia com incapacidade de formar ou reter novas memórias. Porém quando ocorre um dano apenas em um dos hemisférios, o encéfalo pode manter quase que normalmente o funcionamento da memória (BOTTINO et al., 1998).

Além da memória, o hipocampo está relacionado com o posicionamento espacial. Segundo O'Keefe e Nadel (1978), o hipocampo relaciona-se ao posicionamento espacial através de um "mapa cognitivo". Por meio de estudos com neurônios do hipocampo de ratos foi constatada uma atividade relacionada com a localização do animal em seu ambiente. Na época mesmo havendo muito ceticismo de outros investigadores quanto aos trabalhos, O'Keefe e principalmente Lynn Nadel, continuaram a investigar esta questão o que levou à um livro muito influente na área em 1978, o "Hipocampo como um mapa cognitivo". Nele foi proposto que a atividade acumulativa dos neurônios do hipocampo fornece uma representação do mapa do ambiente, o que ajuda o animal a se orientar. E este mapa cognitivo também incorpora a informação sobre a localização de objetos (O'KEEFE & NADEL, 1978). Tal como acontece com a teoria da memória, há agora quase um consenso que o hipocampo desempenha um papel importante na codificação espacial, com resultados que demonstram atividade sináptica nas diferentes regiões do hipocampo, mudanças morfológicas, sendo que, mais detalhes continuam sendo elucidados (CHERSI & PEZZULO, 2012).

As estruturas que beiram a linha do córtex compõem o chamado sistema límbico: estes incluem o hipocampo, córtex cingulado, córtex olfativo e amígdala (ISOLAN et al., 2007). Paul MacLean em 1949 sugeriu, como parte de sua teoria do cérebro triuno, que as estruturas límbicas compreendem a base neural da emoção, porém até hoje alguns cientistas não aceitam o conceito de que um "sistema límbico" unificado é válido. No entanto, o hipocampo é anatomicamente ligado a partes do encéfalo que estão envolvidas com o comportamento emocional, tais como, o septo, o hipotálamo, corpo mamilar e o complexo nuclear anterior do tálamo (TAVARES, 2006).

O hipocampo possui duas principais partes interligadas: Corno de Amon (CA) que é o hipocampo propriamente dito e o giro denteado (GD). No giro denteado do hipocampo, novos neurônios são continuamente gerados na zona subgranular durante toda a idade adulta em muitos mamíferos, incluindo camundongos, ratos, macacos e seres humanos (ALTMAN & DAS, 1965). Os neurônios recém gerados formam sinapses e são funcionalmente integrados em circuitos neuronais do hipocampo existentes (VAN PRAAG et al., 2002) ou não forma sinapses e morrem.

A formação hipocampal está dividida em quatro regiões corticais: o giro denteado, o hipocampo propriamente dito, o complexo subicular e o córtex entorrinal (ver Figura 1). O giro denteado que é a região analisada no presente trabalho, também pode ser dividido, no entanto em três camadas: a molecular, a camada de células granulares e a camada polimórfica (hilo). Já o Corno de Amon (CA) que é o hipocampo propriamente dito é dividido em: CA1, CA2 e CA3. Cada uma dessas regiões mantém um padrão organizado de conexões intrínsecas e extrínsecas, sendo que a principal aferência para o hipocampo origina-se no córtex entorrinal (CE). As fibras que deixam o CE em direção ao hipocampo constituem a “via perfurante” que inervam os dendritos das células granulares na região da camada molecular do giro denteado (GD). Os axônios das células granulares (“fibras musgosas”) projetam-se para as células piramidais da região de CA3, que então emitem fibras para a região de CA1, constituindo a chamada “via colateral de Schaffer”. De CA1, as fibras projetam-se para o complexo subicular e então para as camadas profundas do córtex entorrinal. O circuito CE-GD-CA3-CA1 é tradicionalmente denominado “via trissináptica” e utiliza principalmente o glutamato como neurotransmissor (SCORZA et al., 2004; VIOLA, 2009).

O hipocampo está dividido em três camadas, a camada molecular, plexiforme e as células piramidais (AMARAL & WITTER, 1989; VIOLA et al., 2009). A camada piramidal possui em sua grande parte os corpos das células piramidais, já as camadas moleculares e plexiforme são definidas pelo neurópilo. Neurópilo é uma densa rede de fibras nervosas amielínicas, constituída de processos gliais, fibrilas, terminais sinápticos, axônios e dendritos dispersos entre as células nervosas da substância cinzenta (AMARAL & WITTER, 1989).

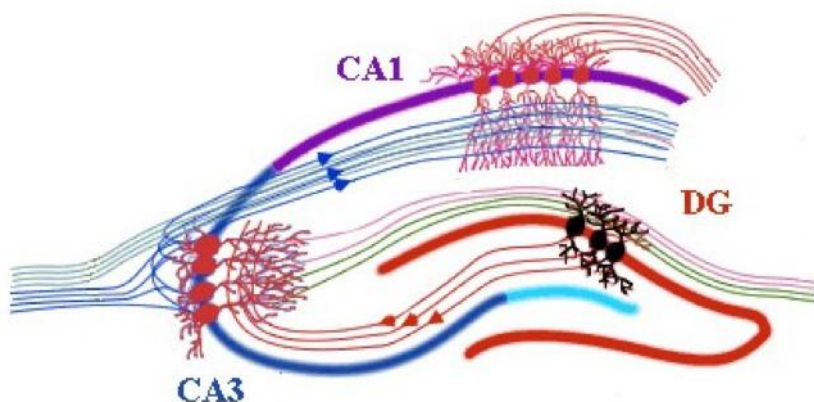


Fig. 1: Representação esquemática do hipocampo, mostrando as regiões hipocâmpais e a circuitaria hipocâmpal. O giro denteado está representado como um traço em vermelho com seus neurônios em preto. As fibras musgosas estão representadas como um traço fino vermelho, fazendo sinapse com os neurônios da região CA3 (em vermelho) e as colaterais de Schaffer, em azul que saem de CA3 fazendo contato com dendritos localizados no Stratum Radiatum da região CA1.

Muitos estudos demonstram que animais de laboratório apresentam um aumento de neurogênese no hipocampo em resposta a estímulos fisiológicos ou a tarefas que exijam habilidades de aprendizagem e memória. A exposição ao enriquecimento ambiental aumenta a proliferação celular, a sobrevivência de novos neurônios imaturos no GD de camundongos adultos (KEMPERMANN et al.,

1997a). O treinamento no labirinto aquático de Morris (tarefa de aprendizagem espacial dependente do hipocampo) também aumenta a sobrevivência de novos neurônios imaturos no GD de ratos adultos (SCHAEFFER, 2010). Como foi visto, o hipocampo é uma região do encéfalo que se relaciona com a aquisição, consolidação e evocação de memórias, com o posicionamento espacial, mas atualmente também é possível relacioná-lo como uma das poucas regiões encefálicas onde ocorre a formação de novos neurônios, a neurogênese.

1.3. Neurogênese

Por muito tempo se pensou que o sistema nervoso de indivíduos adultos fosse incapaz de formar novos neurônios (COLUCCI-d'AMATO & DI PORZIO, 2008). Ramon y Cajal (1913) havia descrito que nenhuma fase mitótica nem estágios de desenvolvimento de novos neurônios foram vistos em encéfalo adulto (RAMON y CAJAL, 1913). Além disso, a grande estabilidade dessa estrutura elaborada que é o encéfalo não condizia com o processo de formação de novas células no encéfalo adulto, além daquelas já estabelecidas no nascimento. Outra evidência para este pensamento foi na área clínica, em que pacientes com doenças degenerativas como Alzheimer e Parkinson não apresentavam uma melhora, ou seja, o indivíduo continuava a perder suas células sem que novas células saudáveis fossem incorporadas (MELO, 2007). Dessa forma, postulou-se que o sistema nervoso central possuía conexões fixas e imutáveis, sem possibilidade de que novos neurônios surgissem. No entanto, com o desenvolvimento de novas técnicas, hoje é possível confirmar a existência da neurogênese em idade adulta. Na primeira metade do século XX, alguns estudos mostraram a existência da formação de novas células (ALLEN, 1912; SUGITA, 1918). Porém, havia uma grande dificuldade em afirmar se estas novas células eram mesmo neurônios ou glia, por causa de várias limitações metodológicas da época. Contudo, na década de 60, Altman publicou alguns estudos mostrando a ocorrência de neurogênese em ratos jovens e adultos (ALTMAN, 1962; ALTMAN, 1963; ALTMAN & DAS, 1965; ALTMAN, 1966; ALTMAN, 1969). Utilizando a técnica em que uma substância

(timidina) que se incorpora ao DNA das células em divisão, a autoradiografia com [3H]-Timidina, Altman observou a formação de novas células em algumas áreas como o neocórtex, giro denteado e bulbo olfatório. Diante do ceticismo da comunidade científica, estas contribuições de Altman permaneceram ignoradas por muitos anos. Hoje, com metodologias mais sofisticadas, estas células novas são observadas, sobretudo, em duas regiões do encéfalo como a Zona subventricular (ZSV) que é situada nas paredes dos ventrículos laterais, onde as novas células migram para o bulbo olfatório através do fluxo migratório rostral, e também na Zona subgranular (ZSG) (SCHAEFFER, 2010) (Figura 2), que é a parte inferior do giro denteado no hipocampo.

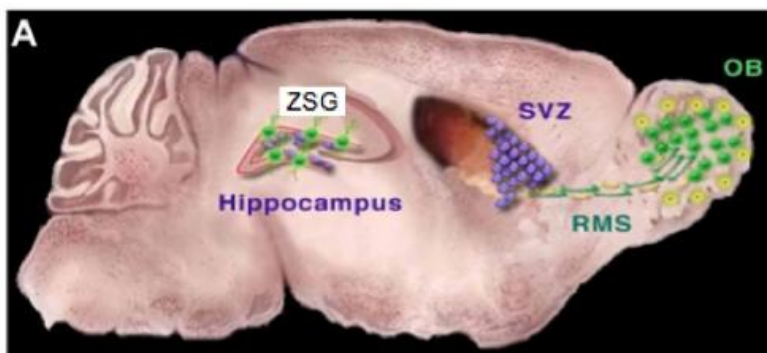


Fig. 2: Regiões de ocorrência de neurogênese no encéfalo adulto de roedores. SVZ – zona subventricular (ZSV). RMS – corrente migratória rostral. ZSG – zona subgranular. Adaptado de Lichtenwalner & Parent JCBFM, 2006.

Em mamíferos a neurogênese só foi aceita em 1990 através do uso de marcadores moleculares mais precisos, como as técnicas imunoistoquímicas aliadas à detecção de análogos de nucleotídeos como a Bromodesoxiuridina (BrdU) (COLUCCI-d'AMATO & DI PORZIO, 2008). Por meio de vários estudos houve a confirmação de neurogênese no giro denteado do hipocampo de roedores adultos (CAMERON et al., 1993; SEKI & ARAI, 1993) assim como em primatas humanos e não humanos (GOULD et al., 1998; KORNACK & RAKIC,

1999). Hoje existem vários estudos que demonstram a neurogênese em adultos de diversos grupos de vertebrados e em menor número em invertebrados (ZUPANC, 2008; CAYRE et al., 2002).

Muitas das células novas morrem pouco depois do nascimento, mas algumas delas se tornam funcionalmente integradas no tecido cerebral e a circuitaria neuronal. O processo de origem destas novas células envolve a divisão celular, a migração e a diferenciação de células progenitoras neurais (CPN) (CHAERKADY et al., 2009; MELLEU, 2009). Uma característica geral destas células, em qualquer região do encéfalo, é que possui uma proliferação baixa e muito lenta, quando comparado aos demais tecidos que se regeneram no organismo (MOMMA et al., 2000). Essas CPNs são representadas por um tipo especial de células somáticas que geram diferentes linhagens celulares e possuem capacidade de auto renovação a longo prazo. As células precursoras se dividem simetricamente e dão origem a novas células idênticas às células mães, e assimetricamente dão origem a células que irão se diferenciar em neurônios e/ou células da glia (CAYRE et al., 2002). É bem demonstrado que em cultura, essas células multipotentes podem gerar tanto células gliais quanto neurônios (AHMED, 2009).

O nível de neurogênese adulta é positiva e negativamente modulada pelas condições ambientais, atividade neuronal, envelhecimento, estresse, entre outros fatores (MING & SONG, 2005; ZHAO et al., 2003). Muitos estudos apontam a importância funcional da neurogênese adulta em processos que envolvem a resposta a antidepressivos, distúrbios do sistema nervoso central e aprendizagem e memória (ZHAO et al., 2003; AIMONE et al., 2011). Condições de ambiente enriquecido em que oferecem uma combinação de vários estímulos também podem aumentar a neurogênese e a sobrevivência destes novos neurônios (SCHAEFERS, 2012). Roedores adultos que são mantidos em AE em que contém a adição objetos como brinquedos, rodas para atividade física, túneis e obstáculos, apresentam significativo aumento no número de células no GD do hipocampo (KEMPERMANN et al., 1997b). Portanto, parece que o aumento da atividade exploratória proporcionada pelos diversos estímulos do AE ajudam na aprendizagem, fazendo com que esses animais aumentem a sua capacidade de desempenhar tarefas cognitivas, quando comparados com animais da mesma linhagem criados em caixas-padrão. Dessa forma, a neurogênese no hipocampo

é regulada por diferentes variáveis ambientais (VAN PRAAG, 2002), reforçando a ideia de que a produção de novos neurônios não faz parte somente dos estágios iniciais do desenvolvimento do sistema nervoso, mas constituem um recurso neural flexível e adaptativo também na idade adulta.

As adversidades e pressões do meio exigem que outros mecanismos neurais sejam desenvolvidos, influenciando na sobrevivência dos animais, pois eles não nascem com um repertório comportamental completo. Com isso, a plasticidade do sistema nervoso tem um papel fundamental na adaptação às variações ambientais. Hoje a neurogênese é um fenômeno muito bem estabelecido e amplamente aceito, podendo ser considerado como um mecanismo que o sistema nervoso desenvolveu para responder às demandas do meio (SILVA, 2009). Contudo, estudos que envolvem o tema são grande importância para melhor elucidar situações que interfiram na neurogênese e na sobrevivência destas novas células. E no caso do presente trabalho, foi avaliada a influência que o enriquecimento ambiental possui sobre o giro denteado de camundongos suíços jovens.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Este trabalho tem como objetivo avaliar a possibilidade de aumento da neurogênese no giro denteado de camundongos suíços machos criados em ambiente enriquecido.

Objetivos específicos:

- a) Determinar o número de neurônios recém nascidos no giro denteado do hipocampo de camundongos suíços jovens. Contagem de células Double-cortina (DCX) positivas para o estudo quanto a quantidade de neurônios imaturos
- b) Determinar o número de células em proliferação no giro denteado do hipocampo de camundongos suíços jovens.

3. ESTRATÉGIA DE AÇÃO

Para atingirmos os objetivos propostos selecionamos um protocolo de enriquecimento ambiental por 9 semanas, a partir do desmame, que já se mostrou efetivo em induzir gênese astrocitária no hipocampo de camundongos CF1 (VIOLA et al., 2009) e suíços (DINIZ et al., 2010). Para determinar a presença de neurônios recém nascidos e células em proliferação foram selecionadas as imunoistoquímicas para detecção das proteínas DCX (SILVA, 2011) e Ki-67, respectivamente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos animais e condições de alojamento

Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e alojados no biotério Setorial da Bioquímica. Foram utilizados camundongos suíços, machos, sendo 10 animais de 21 dias (após desmame) para o grupo do ambiente enriquecido (AE) e o outro grupo controle (C) também com 10 animais com 21 dias. A temperatura do biotério setorial foi mantida em 21 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Todos os animais receberam água e ração à vontade. Os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética da UFSC sob o Ofício nº CEUA - PP00795. O ambiente padrão consiste em uma caixa de polipropileno branco com as dimensões: 42 x 32 x 17 (comprimento x largura x altura, ver Figura 3B), forrada com maravalha.

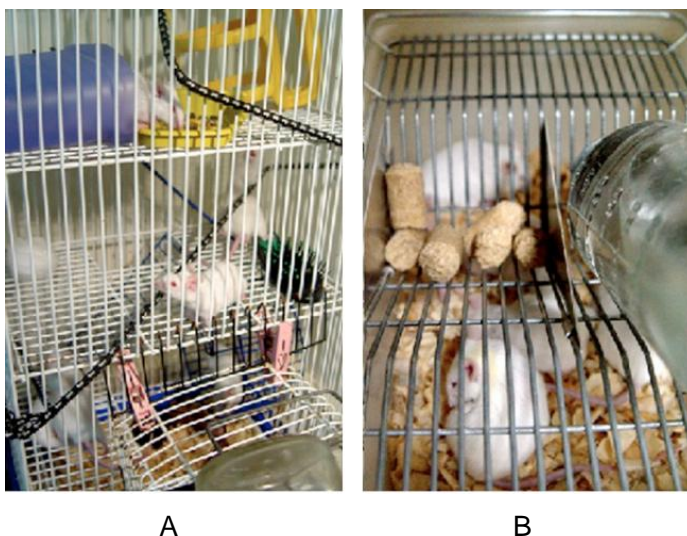


Fig. 3 – Tipos de alojamento. A) gaiola utilizada para o ambiente enriquecido e B) caixa utilizada para o ambiente padrão (adaptado de Amaral e cols., 2008).

4.2. Ambiente enriquecido

O grupo do ambiente enriquecido (AE) foi criado em uma caixa de acrílico de 42 cm x 32 cm x 17 cm, acoplada a uma gaiola de 28 cm x 21 cm x 50 cm com três andares (ver Figura 3A). Os animais foram criados em AE por nove semanas em caixas com três rodas de correr, objetos de plásticos, de madeira ou metal. Além disso, foram utilizados canos que os animais podem usar para navegação e construção de ninhos além de proteção a luz, o que favorece o comportamento natural dos camundongos, pois estes são animais notívagos. Adicionalmente, os objetos são trocados 2 vezes por semana para estimular a formação de mapas espaciais.

4.3. Eutanásia

Os animais foram anestesiados com uma dose de Hidrato de Cloral 7% e perfundidos com solução salina 0,9% seguida de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M em pH 7,4. Os encéfalos foram removidos da calota craniana e mantidos por 4hs na mesma solução.

4.4. Microtomia

Após esse período os encéfalos foram mantidos em sacarose 30% por dois dias e congelados em freezer -80°C. Os encéfalos foram congelados e seccionados a 50 µm em um criostato (marca Leica® 1850) na região do hipocampo. As secções foram armazenadas em tubos (tipo Eppendorf contendo solução anticongelante) organizados em sequência contendo a secções separadas entre si por 250 µm. O primeiro tubo foi utilizado para imunistoquímica para DCX e o segundo tubo para imunistoquímica para Ki-67. Os demais tubos foram guardados para imunistoquímicas futuras.

4.5. Imunoistoquímica para os marcadores de novos neurônios e células em proliferação

A imunoistoquímica foi feita para detectar as proteínas Ki-67 e DCX. Consiste em dois dias para o procedimento.

1º DIA

- 1.** 3 lavagens de 5 min com o tampão A (0,1M de PBS + Triton);
- 2.** Incubação no bloqueio da peroxidase endógena (metanol + H₂O₂ a 0,3%) por 30 min;
- 3.** 3 lavagens de 5 min com tampão A;
- 4.** Incubação no bloqueio inespecífico (Soro Albumina Bovina - BSA1%) em tampão A por 60min;
- 5.** Incubação no anticorpo primário diluído em BSA1% durante a noite (mínimo 18 h), a 4°C. Anticorpos primários utilizados: anti-DCX: diluição 1:5000; anticorpo desenvolvido em coelho (IgG, policlonal) fabricado por Abcam®, cód. ab18723. E anti-Ki-67: diluição 1:500; anticorpo desenvolvido em coelho (IgG, policlonal), fabricado por Acris®, cód. DRM 004;

2º DIA

- 6.** 3 lavagens de 5 min com tampão A;
- 7.** Incubação no anticorpo secundário por 90 min, diluído em tampão A (Vectastain® Elite ABC kit anti-coelho IgG, fabricado por Vector labs, diluição 1:1000);
- 8.** 3 lavagens de 5 min com tampão A;
- 9.** Incubação no complexo avidina + peroxidase biotinilada (ABC) por 120 min, diluído em tampão A (Vectastain® Elite ABC kit anti-coelho IgG, fabricado por Vector labs, diluição avidina 1:500 e biotina 1:500);
- 10.** 3 lavagens de 5 min com tampão A;
- 11.** 1 lavagem de 5 mins com TBS 0,1M;
- 12.** Incubação em 3'3-Diaminobenzidina (DAB) por 10 min;
- 13.** Incubação em DAB + peróxido de hidrogênio 0,03% por 10 min;
- 14.** 3 lavagens de 5 min com TBS 0,25M;
- 15.** 1 lavagem de 5 min com água destilada;

Colocar as secções nas lâminas e deixar secar por 5 dias em temperatura ambiente. Para depois então realizar o processo de diafanização.

Anticorpo Ki-67

O anticorpo Ki-67 é uma igG de camundongo que reconhece um antígeno que está associado ao núcleo celular e é expresso em todas as fases do ciclo celular, principalmente nas fases G2 e M. Muitos trabalhos têm utilizado o Ki-67 como marcador de proliferação celular, por não sofrer tantas influências de fatores internos e externos, sendo utilizado como um marcador biológico.

Anticorpo Doublecortina

A Doublecortina ou DCX é um marcador endógeno de células mitóticas pois se associa aos microtúbulos de células neuronais imaturas, sendo utilizado como um marcador para células em proliferação.

4.6. Diafanização das lâminas

Após os 5 dias de secagem, as lâminas seguiram o seguinte procedimento:

1. Mergulhou-se em água destilada;
2. Retirada do excesso de água com papel;
3. Mergulhou-se por poucos segundos em corante
4. Mergulhou-se em álcool 70% por 1 min;
5. Mergulhou-se em álcool 90% por 1 min;
6. Tirou-se o excesso com papel;
7. Mergulhou-se em álcool 100% I por 3 min;
8. Mergulhou-se em álcool 100% II por 3 min;
9. Tirou-se o excesso com papel;
10. Mergulhou-se em Xilol I por 10 min;
11. Mergulhou-se em Xilol II por 15 min;
12. Mergulhou-se em Xilol III por 15 min;
13. Tirou-se as lâminas para montá-las;

14. Com DPX colar a lamínula delicadamente na lâmina
15. Secagem entre 5 a 10 dias.

As lâminas que continham as secções marcadas para Ki-67 e DCX foram coradas com Giemsa por 3 s no início da diafanização.

4.7. Microscopia

A imunorreatividade presente nas secções foi analisada com o auxílio do microscópio óptico de campo claro (Olympus BH2). Os campos foram fotografados com auxílio de uma câmara digital Pixelink®, operada pelo programa de computador da própria câmara. Cada giro denteado (direito e esquerdo) foi fotografado de forma sequencial, da extremidade medial à lateral com o aumento de 200 vezes.

4.8. Contagem de células

A quantificação das células imunorreativas a proteína DCX foi realizada com o uso do programa ImageJ® (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A quantificação do número de células expressando DCX ou Ki-67 foi feita por GD, ou seja, o número de células DCX+ ou Ki-67+ foi contado ao longo do giro denteado, direitos e esquerdos, sendo que o total de células contadas foi dividido pelo número de giros analisados. A contagem das células não foi distinta entre hipocampo direito e esquerdo. Foram contadas as células individuais positivas para DCX e Ki-67 assim como a quantidade de Clusters (aglomerado de células) para DCX. Para os cortes de DCX foi escolhida a região dorsal do hipocampo correspondente ao Bregma -2.06mm em camundongos, referente ao Atlas Franklin Paxinos 1997.

As contagens foram feitas às cegas, por meio de códigos feitos para cada foto que o contador não tinha conhecimento. As

características para reconhecer uma célula DCX+ foram coloração acinzentada no corpo celular com ou sem projeções dendríticas e com núcleo claro (ver Figura 4A e 4B). Adicionalmente foram contados os agrupamentos de DCX+ (Clusters). Os clusters foram definidos como um agrupamento de células em que era difícil fazer a sua individualização, ou seja, sua contagem. Portanto foram contados estes agrupamentos de células e não as células individuais. A marcação do Ki-67 é nuclear (pontos arredondados e bem escuros) e de fácil visualização, neste a contagem foi realizada diretamente pela observação no microscópio.

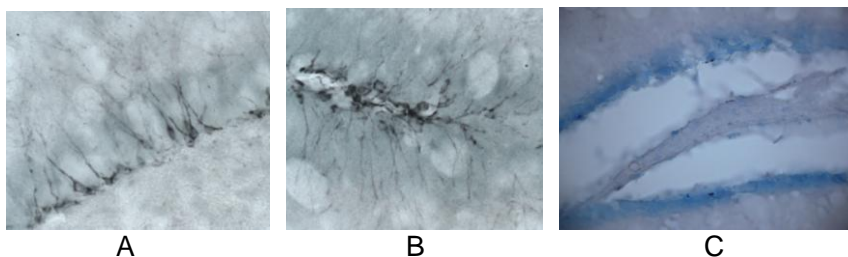


Fig. 4 – Em A) fotografia de células individualizadas; B) fotografia de Cluster. Marcação de DCX, 200x; C) fotografia de células individualizadas marcadas com Ki-67.

4.9. Análise estatística

Para testar a distribuição dos dados, realizamos o teste de Kolmogorov-Smirnov, tendo que os dados não apresentavam distribuição normal utilizamos testes não paramétricos.

Para todos os parâmetros analisados, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, sendo adotado o nível de significância de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Foram contadas as células em 10 GD (5 do lado esquerdo e 5 do direito) de AE e 10 GD (5 do lado esquerdo e 5 do direito) de ambiente padrão para o anticorpo Doublecortina (DCX). Foram contadas células individuais (ver Figura 4a e Figura 5) e também foram contados os agrupamentos de células (ver Figura 4b e Figura 6) em que não era possível se fazer uma contagem individualizada.

A contagem do número de células individualizadas marcadas com doublecortina indicou que não há diferença na quantidade de neurônios imaturos no giro denteado ($p=0,06$), quando comparamos camundongos suíços machos criados em diferentes condições ambientais.

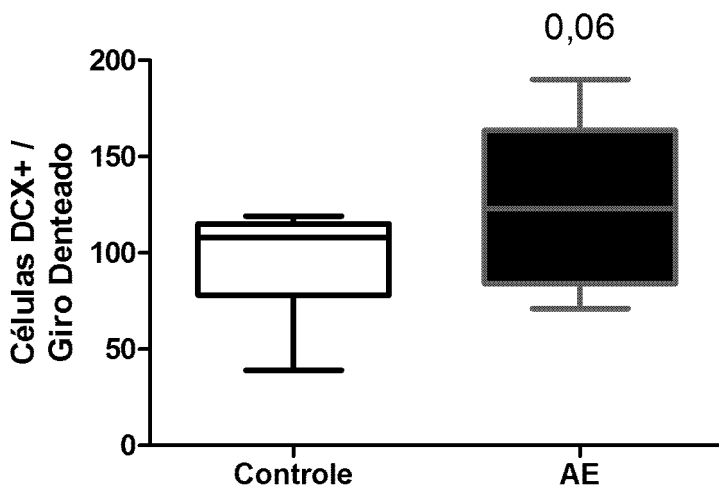


Fig. 5 – Gráfico obtido após contagem de células individuais marcadas com DCX+, onde animais do ambiente padrão estão representados pela barra branca e animais do AE estão representados pela barra preta. Resultado expresso em mediana \pm intervalo interquartil. Não ocorre diferença estatística entre os grupos ($p=0,06$).

A quantidade de grupamentos celulares marcados com doublecortina indicou que não há diferença na quantidade de grupamentos de neurônios imaturos no giro denteado ($p=0,44$), quando comparamos camundongos suíços machos criados em diferentes condições ambientais.

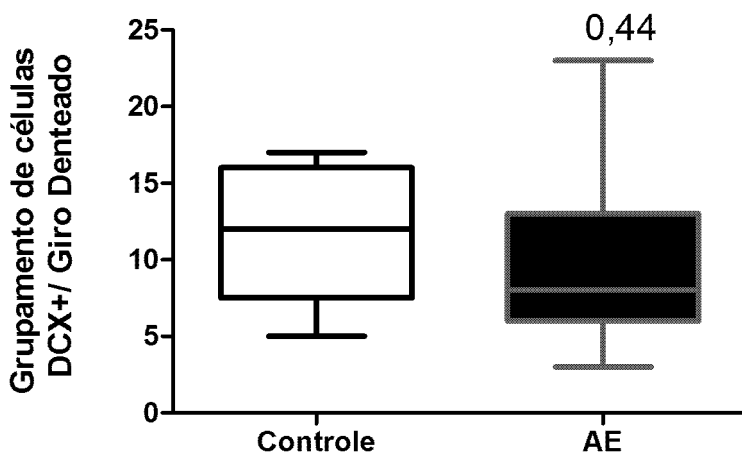


Fig. 6 – Gráfico obtido após a contagem dos agrupamentos de células DCX+ que não podiam ser individualizadas. Ambiente padrão está representado com a barra branca e o AE com a barra preta. Resultado expresso em mediana \pm intervalo interquartil. Não ocorre diferença estatística entre os grupos ($p=0,44$).

A contagem para as células marcadas com Ki-67 foi feita diretamente pela observação no microscópio, pois eram de fácil visualização e possuíam um menor número de células (comparado às células DCX). Foram contadas 5 secções de hipocampus de cada um dos animais criados em AE e 5 secções de hipocampo de cada um dos animais criados em ambiente padrão, para as células imunorreativas ao anticorpo Ki-67 foram observadas tanto no lado esquerdo como no direito dos GD. A contagem de células marcadas com Ki-67 indicou que não há diferença na proliferação celular no giro denteado ($p=0,17$), quando comparamos camundongos suíços machos criados em diferentes condições ambientais.

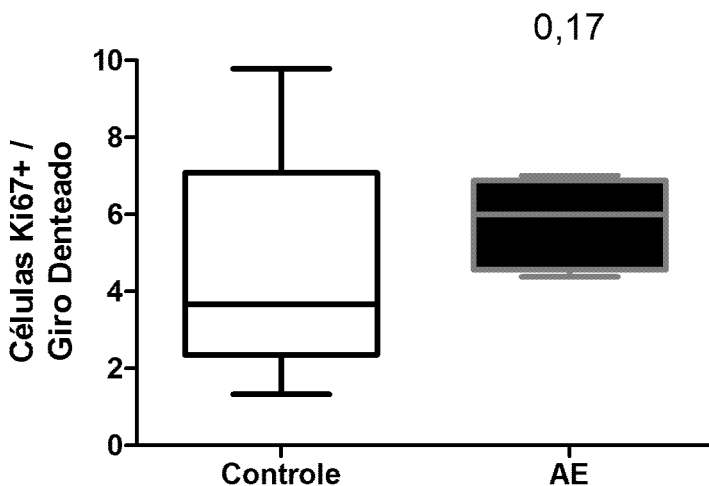


Fig. 7 - Gráfico representativo da contagem de Ki-67+ em relação ao ambiente padrão (em branco) e AE (em preto). Resultado expresso em mediana \pm intervalo interquartil. Não ocorre diferença estatística entre os grupos ($p=0,17$).

5. DISCUSSÃO

Através de vários estudos, pode-se ver que a literatura descreve que o ambiente enriquecido aumenta a gênese de novos neurônios no giro denteado, aumentando também a sobrevivência destas novas células (KEMPERMANN et al., 1997b; KEMPERMANN et al., 1998; VAN PRAAG et al., 1999). Adicionalmente o EA é capaz de modificar o comportamento de camundongos nas mais diversas tarefas (AMARAL et al., 2008; VIOLA et al., 2010). Entretanto como pode ser visto no presente trabalho, o AE por nove semanas não promoveu aumento na neurogênese no giro denteado de camundongos suíços. Portanto neste estudo não houve diferença na gênese de neurônios novos com a mudança do ambiente. Este resultado é contrário à grande parte da

literatura atual, que reporta em grande quantidade de trabalhos o aumento da neurogênese em animais de laboratório criados em AE (KEMPERMANN et al., 1997b; KEMPERMANN et al., 1998; VAN PRAAG et al., 1999; SCHAEFERS, 2012), entretanto alguns trabalhos realizados na mesma linhagem, mas com protocolos de EA diferentes reportam que o AE não altera a neurogênese no giro denteado (PODOLAN, 2011; SILVA, 2011). Portanto podemos atribuir nossos resultados primeiramente a uma característica da linhagem utilizada em nossos experimentos. Em um segundo plano podemos pensar que diferenças entre as metodologias empregadas no AE, tais como: o tempo em AE, idade inicial, objetos utilizados, possam estar influenciando nos resultados obtidos.

Como foi descrito por Bloomsmith e col. (1991), o enriquecimento pode ser utilizado de várias formas, como o enriquecimento social, cognitivo, físico, sensorial e nutricional. Como cada tipo de enriquecimento há um estímulo diferente e cada AE pode ser montado de várias formas, os resultados podem diferir quanto à metodologia empregada. Atualmente muitos tipos de AE são utilizados para camundongos (KEMPERMANN et al., 1998) e principalmente por meio do uso de rodas de correr e a interação social resulta em um aumento de neurogênese e mudanças no comportamento (VAN PRAAG et al., 1999). Em um trabalho com a linhagem C57BL/6, Fabel e col. (2010) utilizaram a metodologia em que os animais foram expostos por 10 dias ao exercício físico voluntário através de rodas de correr e após 35 dias ao AE, e com isso observaram um aumento de 30% na neurogênese. Por outro lado, Madroñal e col. (2010) não observaram diferenças na neurogênese hipocampal comparando quatro grupos de camundongos (C57BL/6) alojados de forma diferente: um grupo em que o animal ficou durante um mês sozinho em AP, sozinho em AE, com interação social em AP e com interação social em AE. Já no trabalho de Podolan (2011), em que foram utilizados camundongos suíços, nenhuma diferença significativa na neurogênese hipocampal, em relação ao ambiente padrão, foram observadas em camundongos suíços criados em AE (que consistia em uma gaiola de três andares, com brinquedos trocados uma vez por semana, duas rodas de correr, escadas e tubos). Com isso pode-se perceber que os mais variados protocolos apresentam uma discrepância em relação à neurogênese.

Além dos tipos de enriquecimento, também pode haver diferenças quanto ao tempo em que o animal tem contato com o enriquecimento.

O tempo de exposição ao enriquecimento pode variar muito, e até períodos curtos de enriquecimento como de 11 a 14 dias são suficientes para apresentar modificações na gênese de células no hipocampo, assim como afetar no comportamento de roedores (BRUEL-JUNGERMAN e col., 2005; ELLIOT & GRUNBERG, 2005). Com 11 dias de contato com o enriquecimento já pode ser observada uma modificação do comportamento locomotor de ratos Sprague-Dawley, e com uma maior exposição ao AE também há uma melhora na aprendizagem espacial do labirinto aquático, diminui a locomoção em campo aberto e a exploração de objetos em ratos e em camundongos 129Sv/Ev e C57BL/6 (MESHI et al., 2006). No trabalho de Bruel-Jungerman e col. (2005) observou-se que ratos Sprague-Dawley apresentavam aumento na sobrevivência celular após 14 dias de exposição ao enriquecimento. A exposição ao AE por 30 dias (MESHI et al., 2006), assim como por 8 semanas (FABEL et al., 2009), continuam apresentando o aumento na neurogênese hipocampal de camundongos adultos, mostrando que com o aumento do tempo em AE, o aumento de neurogênese continua sendo observado. No presente trabalho utilizamos o AE por nove semanas, com os animais (camundongos suíços) tendo livre acesso a três rodas de correr e interação social e não ocorreu aumento na neurogênese. Estes dados são similares aos observados no trabalho de Podolan (2011) que possui uma metodologia semelhante, que também utilizou rodas de correr e interação social, porém os animais iniciaram o enriquecimento com 60 dias de vida e foram mantidos em AE somente por 30 dias. Portanto acredita-se que o tempo utilizado no presente trabalho (de nove semanas) seria o suficiente para corroborar com os resultados de outros trabalhos. Contudo o tipo e o tempo de enriquecimento não parecem ser o motivo das diferenças encontradas em relação à literatura, podendo, portanto estar relacionado diretamente à linhagem utilizada no experimento.

Segundo Van Praag e col. (1999) foi observado um aumento na gênese de novas células no hipocampo de camundongos C57BL/6 que realizaram apenas exercício físico voluntário, sem a presença de outro elemento de enriquecimento. Já no trabalho de Meshi e col. (2006) verificou-se que houve um aumento no número de células proliferativas no hipocampo de camundongos da linhagem 129Sv/Ev expostos ao AE. No trabalho de Schaefer (2012) em que foi feita a comparação entre as linhagens CD1, C57BL/6 e descendentes de camundongos

selvagens, pode-se observar que após serem submetidas a uma privação social seguida de atividade física, as linhagens CD1 e C57BL/6 apresentaram um aumento na taxa de proliferação celular e uma maior sobrevivência desses novos neurônios. No entanto os descendentes dos camundongos selvagens não apresentaram nenhuma diferença na proliferação (SCHAEFERS, 2012). Em contra partida, um estudo que também utilizou a linhagem de camundongos suíços e que os resultados corroboram com os resultados deste presente trabalho, Podolan (2011) observou que não houve aumento no número de novas células no giro denteado após 30 dias em enriquecimento. Embora, o AE utilizado no presente trabalho contenha os elementos de enriquecimento utilizados em trabalhos nos quais foi observado aumento na neurogênese e os animais tenham sido mantidos no AE por um tempo descrito na literatura como suficiente para gênese de novos neurônios (SCHAEFERS, 2012), não houve uma diferença significativa na neurogênese entre animais controle e AE. Kempermann e col. (1997a) utilizando-se de quatro tipos de linhagens (C57BL/6, BALB/c, CD1 e 129Sv/J demonstraram que a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência celular no GD varia entre as linhagens de camundongos. De fato estes pesquisadores verificaram que a linhagem 129Sv/J apresenta uma menor sobrevivência celular. Já os animais da linhagem C57BL/6 apresentam uma maior taxa de proliferação (1,5 vezes maior que as outras linhagens) (Kempermann et al. 1997a). Nossos resultados reforçam a ideia de que cada linhagem possui suas características particulares e que a linhagem escolhida (camundongos suíços albino) para este trabalho necessita de maiores estudos para avaliar as diferenças encontradas com a mesma. Visto que, em outros estudos com esta linhagem Silva et al., 2011 e Podolan 2011 utilizando a linhagem de camundongo suíço, não foi observado aumento na neurogênese podemos pensar que camundongos suíços não sejam tão sensíveis ao enriquecimento quanto outras linhagens. No entanto a utilização de variações de tempo, período de vida do início do EA ou do próprio protocolo de enriquecimento podem ser utilizados na busca de elucidar esta questão.

Outra possibilidade que não pode ser descartada é a influência do meio externo às caixas. Segundo Bernard e Green (1957) o meio interno de um organismo deve permanecer constante, ou seja, deve se encontrar estável mesmo havendo mudanças externas. Esse conceito

foi o ponto de partida para os estudos sobre o estresse de Selye. Para Selye (1974), estresse é uma resposta bio-comportamental do organismo a qualquer agente estressor que perturbe a homeostase, a ponto de comprometer a regulação das respostas, sendo observado em todos os animais (PIZZUTTO et al., 2009). O estresse pode ocorrer a partir de vários fatores, tais como: os sons do ambiente, odores sentidos pelos animais no local, entre outros. Uma das ideias que pode explicar em parte os resultados obtidos é de que o micro ambiente (caixa do AE e caixa-padrão) estavam inseridos no macro ambiente (sala do biotério), onde recebiam os mesmos estímulos auditivos como o sons de outros animais em caixas adjacentes, assim como os sons da manutenção e limpeza dos animais do biotério, algo inerente as condições de qualquer biotério. Além disso, o inevitável trânsito de pessoas no local pode causar um leve desconforto nos animais também através de odores como desodorantes e perfumes. Estes fatores ocorrem em qualquer cativeiro como zoológicos, biotérios e locais em que o animal seja criado, sendo difícil evitar estes agentes estressores externos. O fato dos animais tanto do AE como do ambiente padrão terem recebido estes mesmos estímulos, pode ter afetado de forma indireta nos resultados obtidos. Partindo da informação que o estresse pode causar remodelação plástica e uma diminuição da neurogênese (SCORZA et al., 2004; PAULINO et al., 2009), o ambiente exterior à caixa dos animais pode ter fornecido estímulos estressantes aos animais, mostrando portanto a possibilidade de uma diminuição na neurogênese na caixa do AE. Além dos estímulos exteriores às caixas, também pode ter ocorrido um estresse no interior das caixas. Pois quanto a linhagem dos camundongos Suíços, sabe-se que estes animais possuem um quesito de dominância muito premente, sendo que esta característica pode ser exacerbada pelo EA, assim como características de outras linhagens (ABRAMOV et al., 2008), o que poderia ser um fator estressante para os animais diminuindo a gênese de novas células. Entretanto neste trabalho teve-se a atenção de contornar a exacerbação desta característica com a manutenção de dois objetos na caixa sempre que ela era trocada, com isso auxiliando na manutenção de odores e quesitos de dominância.

Em virtude do que foi mencionado, a principal e melhor justificativa encontrada para a ausência do efeito do enriquecimento ambiental nestes animais é a linhagem que foi utilizada. Ainda são necessários

estudos quanto aos camundongos suíços para a elucidação do por que o AE não surtir efeito nesta linhagem. Porém não se pode excluir as diferenças metodológicas para a avaliação da proliferação celular e adicionalmente o fato do protocolo e o tempo de exposição ao enriquecimento podem não ter sido eficazes para alterar a neurogênese nesta linhagem.

6. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos pode-se concluir que o ambiente enriquecido não conferiu aumento na neurogênese do giro denteado do hipocampo de camundongos suíços machos jovens. Estes resultados foram observados tanto para proliferação celular (células Ki-67+), como para neurônios imaturos (células DCX+) individualizados e de agrupamentos marcadas com DCX.

7. PERSPECTIVAS

Uma das perspectivas após o presente trabalho é quanto a um estudo mais aprofundado em relação à linhagem aqui utilizada, a do camundongo suíço. É de grande importância uma caracterização e estudo desta linhagem, pois sabe-se que é muito utilizada nos biotérios no Brasil.

Propõe-se novos testes com diferentes protocolos (troca dos objetos que aqui foram utilizados), diferentes tempos de enriquecimento (tempos maiores e menores a nove semanas), início do enriquecimento num período diferente, bem como a utilização não somente de animais machos, mas também utilizar fêmeas.

REFERÊNCIAS

ABRAMOV, U.; PUUSSAAR, T.; RAUD, S.; KURRIKOFF, K.; VASAR, E. Behavioral differences between C57BL/6 and 129S6/SvEv strains are reinforced by environmental enrichment, **Neuroscience**, 443: 223-227, 2008.

AHMED, S. The Culture of Neural Stem Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, 106: 1-6, 2009.

AIMONE, J. B.; DENG, W.; GAGE, F. H. Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. **Neuron**, 70(4): 589-96, 2011.

ALMEIDA, A. M. R; MARGARIDO, T. C. C; FILHO, E. L. A. Influência do enriquecimento ambiental no comportamento de primatas do gênero *Ateles* em cativeiro. **Arquivos em Ciências Veterinárias e Zootecia**, 11(2): 97-102, 2008.

ALLEN, E. The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat. **Journal of Comparative Neurology**. 19: 547-68, 1912.

ALTMAN, J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? **Science**, 135: 1127–1128, 1962.

ALTMAN, J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. Postnatal growth and differentiation of the mammalian brain, with implications for a morphological theory of memory. **Anatomical Record**, 145: 573–591, 1963.

ALTMAN, J. & DAS, G. D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **Journal of Comparative Neurology**, 124: 319–335, 1965.

ALTMAN, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis II. A longitudinal investigation of the kinetics, migration

and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. **Journal of Comparative Neurology**, 128: 431–474, 1966.

ALTMAN, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. **Journal of Comparative Neurology**, 137: 433–458, 1969.

AMARAL, D. G. & WITTER, M. P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. **Neuroscience**, 31: 571-591, 1989.

AMARAL, O. B.; VARGAS, R. S.; HANSEL, G.; IZQUIERDO, I.; SOUZA, D. O. Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. **Physiology & Behavior**, 93: 388-394, 2008.

ARAQUE, A.; PARPURA, V.; SANZGIRI, R.P.; HAYDON, P.G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. **Trends in Neurosciences**, 22(5):208-15, 1999.

BARONCELLI, L.; BRASCHI, C.; SPOLIDORO, M.; BEGENISIC, T., SALE, A., MAFFEI, L. Nurturing brain plasticity: impact of environmental enrichment. **Cell Death & Differentiation**, 17(7): 1092-103, 2010.

BEGON, M.; HARPER, J. L.; TOWNSEND, C. R. Ecologia - indivíduos, populações e comunidades. **3a edição, Omega**. 1148p. 2008.

BERNARD, C. & GREEN, H.C. Introduction to the study of experimental medicine. **Dover Publications**, 226, 1957.

BLOOMSMITH, M. A.; BRENT, L. Y.; SCHAPIRO, S. J. Guidelines for developing and managing and environmental enrichment program for nonhuman primates. **Laboratory Animal Science**, 41: 372-377, 1991

BOTTINO, C. M. C.; LOUZÃ-NETO, M. R.; CASTRO, C. C.; GOMES, R. L. E. Doença de Alzheimer, transtorno cognitivo leve e envelhecimento normal: avaliação por medidas de ressonância magnética volumétricas. **Revista de Psiquiatria Clínica**, 25(2): 88-97, 1998.

BURNS, J. G.; SARAVANAN, A.; RODD, F. H. Rearing environment affects the brain size of guppies: lab-reared guppies have smaller brains than wild-caught guppies. **Ethology**, 115: 122-133, 2009.

BRUEL-JUNGGERMAN, E.; LAROCHE, S.; RAMPON, C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression. Of enhanced long-term memory following environmental enrichment. **European Journal of Neuroscience**, 21: 513-521, 2005.

CAMERON, H.A.; WOOLLEY, C.S.; MCEWEN, B.S.; GOULD, E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. **Neuroscience**, 56: 337–344, 1993.

CARDOSO, G. A participação do sistema dopaminérgico hipocámpal na consolidação e persistência da memória espacial. 2010. 48f. **Dissertação** (Mestrado em Gerontologia Biomédica) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Instituto de Geriatria e Gerontologia. Porto Alegre, 2010.

CARVALHO, A. F. U.; ARAÚJO, A. J.; FARIAS, D. F.; ROCHA-BEZERRA, L. C. B., CAVALHEIRO, M. G. Development and reproductive performance of Swiss mice in an enriched environment. **Brazilian Journal of Biology**, 69(1), 153-160, 2009.

CAYRE, M.; MALATERRE, J.; SCOTTO-LOMASSESE, S.; STRAMBI, C.; STRAMBI, A. The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. **Comparative Physiology and Biochemistry**, 132: 1-15, 2002.

CHAERKADY, R.; KERR, C.L.; MARIMUTHU, A.; KELKAR, D.S. KASHYAP, M.K.; GUCEK, M.; GEARHART, J.D.; PANDEY, A. Temporal analysis of neural differentiation using quantitative proteomics. **Journal of Proteome Research**, 8: 1315–1326, 2009.

COLUCCI-D'AMATO, L. & di PORZIO U. Neurogenesis in adult CNS: from denial to opportunities and challenges for therapy. **BioEssays**, 30: 135–145, 2008.

CRUZ, J. G. P.; MAGRO, D. D.; CRUZ, J. N. Efeitos da música clássica como elemento de enriquecimento ambiental em *Mus musculus* em cativeiro (Rodentia: Muridae). **Biotemas**, 23(2): 191-197, 2010.

DAMY, S. B.; CAMARGO, R. S.; CHAMMAS, R.; FIGUEIREDO, L. F. P. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 56(1): 103-11, 2010.

DIAMOND, M. C.; KRECH, D.; ROSENZWEIG, M. R. The effects of an enriched environment on the rat cerebral cortex. **Journal of Comparative Neurology**, 123: 111-119, 1964.

DINIZ, D. G.; FORO, C. A. R.; REGO, C. M. D.; GLORIA, D. A.; OLIVEIRA, F. R. R.; PAES, J. M. P.; SOUSA, A. A.; TOUHASHI, T. P.; TRINDADE, L. S.; TURIEL, M. C. P.; VASCONCELOS, E. G. R.; TORRES, J. B.; CUNNIGHAM, C.; PERRY, V. H.; VASCONCELOS, P. F. C.; DINIZ, C. W. P. Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. **European Journal of Neuroscience**, 32: 509-519, 2010.

DUFFY, S. N.; CRADDOCK, K. J.; ABEL, T.; NGUYEN, P. V. Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. **Learn Memory**, 8(1): 26-34, 2001.

ELLIOT, B.M & GRUNBERG, N.E. Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female Sprague–Dawley rats. **Behavioural Brain Research**, 165: 187-196, 2005.

ENGELHARDT, E.; MOREIRA, D. M.; LAKS, J.; MARINHO, V. M.; ROZENTHAL, M. OLIVEIRA-JUNIOR, A. C. Doença de Alzheimer e

espectroscopia por ressonância magnética do hipocampo. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, 59(4): 865-870, 2001.

FABEL, K.; WOLF, S. A.; EHNINGER, D.; BADU, H.; LEAL-GALICIA, P.; KEMPERMANN, G. Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. **Frontiers in Neuroscience**., 3(50): 1-7, 2009.

FERREIRA, Aurélio Buarque de Holanda. **O Dicionário da língua portuguesa**. 3. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1999.

GHIDINI, V. K. Influência do enriquecimento ambiental e do estresse imprevisível em camundongos pré-selecionados pelo perfil exploratório. 2010. 154 f. **Tese** (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da saúde. Porto Alegre, 2010.

GOBBO, O. L. & O'MARA, S. M. Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transiente global ischemia. **Behavioral Brain Research**, 152: 231-241, 2004.

GOULD, E.; TANAPAT, P.; MCEWEN, B.S.; FLUGGE, G.; FUCHS, E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. **The Proceedings of the National Academy of Sciences**, 95: 3168–3171, 1998.

GUANDOLINI, G. C. Enriquecimento ambiental para gatos domesticos (*Felis silvestris catus* L.): a importância dos odores. 2009. 66f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP. Ribeirão Preto, 2009.

GUSMÃO & MONTEIRO. Odor-enriched environment rescues long-term social memory, but does not improve olfaction in social isolated adult mice. **Behavioural Brain Research**, 2012.

JAMAN, M. F., HUFFMAN, M. A. Enclosure environment affects the activity budgets of captive Japanese macaques (*Macaca fuscata*). **American Journal of Primatology**, 70: 1133-44, 2008.

HAWLEY, D. F.; MORCH, K.; CHRISTIE, B. R.; LEASURE, J. L. Differential response of hippocampal subregions to stress and learning. **Plos one**, 7(12): 53126, 2012.

HICKS, A. U.; HEWLETT, K.; WINDLE, V.; CHERNENKO, G.; PLOUGHMAN, M.; JOLKKONEN, J.; WEISS, S.; CORBETT, D. Enriched environment enhances transplanted subventricular zone stem cell migration and functional recovery after stroke. **Neuroscience**, 146(1): 31-40, 2007.

ISOLAN, G. R.; AZAMBUJA, N.; NETO, E. P.; PAGLIOLI, E. Anatomia microcirúrgica do hipocampo na amígdalo-hipocampectomia seletiva sob a perspectiva de técnica de Niemeyer e método pré-operatório para maximizar a corticotomia. **Arquivos em Neuropsiquiatria**, 65: 1062-1069, 2007.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, 386: 493-495, 1997a.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. **Neurobiology**, 94: 10409-10414, 1997b.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. Experience-Induced Neurogenesis in the Senescent Dentate Gyrus. **The Journal of Neuroscience**, 18(9): 3206–3212, 1998.

KIEFER, C.; MEIGNEN, B. C. G.; SANCHES, J. F.; CARRIJO, A. S. Resposta de suínos em crescimento mantidos em diferentes temperaturas. **Arquivos em Zootecnia**, 58(221): 55-64, 2009.

KORNACK, D.R. & RAKIC, P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. **The Proceedings of the National Academy of Sciences**, 96: 5768–5773, 1999.

KRUSKA, D. Mammalian domestication and its effects on brain structure and behavior. *Intelligence and Evolutionary Biology* (Jerison, H. J. 7 Jerison, I., eds). **Springer-Verlag**, 211-250, 1988.

LICHTENWALNER, R. J. & PARENT, J. M. Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 26: 1-20, 2006.

MADROÑAL, N.; LÓPEZ-ARACIL, C.; RANGEL, A.; DEL RIO, J. A.; DELGADO-GARCÍA, J. M.; GRUART, A. Effects of Enriched physical and social environments on motor performance, associative learning, and hippocampal neurogenesis in mice. **Plos one**, 5(6): 1-10, 2010.

MARCUZZO, S. Estudo sobre a densidade de espinhos dendríticos de neurônios da amígdala medial pósterio-dorsal de ratos em diferentes condições experimentais. 2006. 103f. **Dissertação** (Mestrado em Neurociências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Neurociências. Porto Alegre, 2006.

MATTSON, M. P.; MAUDSLEY, S.; MARTIN, B. BDNF and 5-HT: a dynamics duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends in Neuroscience**, 27: 589-594, 2004.

MELLEU, F. F. Distribuição da imunorreatividade à doublecortina no prosencéfalo de pombos adultos (*Columba livia*): avaliação dos efeitos de diferentes condições de alojamento. 2009. 49f. **Monografia** (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.

MELO, L. M.; BARBOSA, E. R.; CARAMELLI, P. Declínio cognitivo e demência associados à doença de Parkinson: características clínicas e tratamento. **Revista de Psiquiatria Clínica**, 34 (4): 176-183, 2007

MENDONÇA-FURTADO, O. Uso de ferramentas como enriquecimento ambiental para macacos-prego (*Cebus apella*) Cativos. 2006. 92f. **Dissertação** (Mestrado em Psicologia) – Universidade de São Paulo, Instituto de Psicologia. São Paulo, 2006.

MESHI, D.; DREW, M.R.; SAXE, M.; ANSORGE. M.S.; DAVID, D.;

SANTARELLI, L.; MALAPANI, C.; MOORE, H.; HEN, R. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. **Nature Neuroscience**, 9(6): 729-731, 2006.

MING, G. & SONG, H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. **The Annual Review of Neuroscience**, 28: 223-50, 2005.

MOMMA, S.; JOHANSSON, C.B.; FRISÉN, J. Get to know your stem cells. **Current opinion in neurology**, 10: 45-49, 2000.

MONTEIRO, B. M. M. Papel da neurogênese nos efeitos promnésicos do ambiente enriquecido sobre a memória social. 2012. 129f. **Dissertação** (Mestrado em Fisiologia e Farmacologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Belo Horizonte, 2012.

MOSER, M. B.; TROMMALD, M.; ANDERSEN, P. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adults rats suggests the formation of new synapses. **The Proceedings of the National Academy of Sciences**, 91: 12673-12675, 1994.

MUHLE, C. B. & BICCA-MARQUES, J. C. Influência do enriquecimento ambiental sobre o comportamento de Bugios-ruivos (*Alouatta guariba clamitans*) em cativeiro. **A primatologia no Brasil** – 9 (FERRARI, S. F. & RÍMOLI, J. Eds). Aracaju, 2008.

NASCIMENTO, V. M. S. Análise do enriquecimento físico e influência do enriquecimento cognitivo no comportamento de bugios (*Alouatta caraya*) mantidos em cativeiro. 2010. 55f. **Monografia** (Curso de Ciências Biológicas) – Universidade do Estado da Bahia. Barreiras, 2010.

NITHIANANTHARAJAH, J. & HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, 7: 697-709, 2006.

NITHIANANTHARAJAH, J.; LEVIS, H.; MURPHY, M. Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. **Neurobiology of Learning and Memory**, 81: 200-210, 2004.

O'KEEFE, J & NADEL, L. The hippocampus as a cognitive map. **Oxford: Clarendon Press**, 570 p., 1978.

PAULINO, C. A.; PREZOTTO, A. O.; CALIXTO, R. F. Associação entre estresse, depressão e tontura: uma breve revisão. **Revista Equilíbrio Corporal e Saúde**, 1: 33-45, 2009.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K.B.J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. Elsevier - Academic press, 2a edição, USA, 2001.

PIZZUTTO, C. S.; SGAÍ, M. G. F. G.; GUIMARÃES, M. A. B. V. O enriquecimento ambiental como ferramenta para melhorar a reprodução e o bem-estar de animais cativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 33(3): 129-138, 2009.

PODOLAN, M. Efeito de uma única injeção intracerebroventricular de imipramina sobre o comportamento e a neurogênese no hipocampo de camundongos suíços adultos: influência da dose, do ambiente e do intervalo entre tratamento e sacrifício. 2011. 92f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

RAMON & CAJAL, S. Degeneration and Regeneration of the Nervous System. **London: Oxford University Press**. 1913.

RIBAS, G. C. Considerações sobre a evolução filogenética do sistema nervoso, o comportamento e a emergência da consciência. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 28(4): 326-38, 2006.

ROSSATO, J. I.; BEVILAQUA, L. R.; MYSKIW, J. C.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learn & Memory**, 14: 36-46, 2007.

ROSSI, C.; ANGELUCCI, A.; COSTANTIN, L.; BRASCHI, C.; MAZZANTINI, M.; BABBINI, F.; FABBRI, M. E.; TESSAROLLO, L.; MAFFEI, L.; BERARDI, N.; CALEO, M. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. **European Journal of Neuroscience**, 24: 1850-1856, 2006.

SCHAEFERS, A. T. U. Rearing conditions and domestication background determine regulation of hippocampal cell proliferation and survival in adulthood – laboratory CD1 and C57BL/6 mice versus wild house mice. **Neuroscience**, 14135, 2012.

SCHAEFFER, E. L. Enriquecimento ambiental como estratégia para promover a neurogênese na doença de Alzheimer: possível participação da fosfolipase A2. **Revista Psiquiatria Clínica**, 37(2): 73-80, 2010.

SCORZA, F. A.; ARIDA, R. M.; CYSNEIROS, R. M.; SCORZA, C. A.; ALBUQUERQUE, M.; CAVALHEIRO, E. A. Estudo qualitativo da formação hippocampal de animais hipertensos com epilepsia. **Arquivos em Neuropsiquiatria**, 63(2-A): 283-288, 2004.

SEKI, T. & ARAI, Y. Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. **The Journal Neuroscience**, 13: 2351–2358, 1993.

SELYE, H. Stress without distress. **McClelland and Stewart**, 171, 1974.

SGAI, M. G. F. G. Avaliação da influência das técnicas de enriquecimento ambiental nos parâmetros endócrinos e comportamentais de *Callithrix penicillata* (sagüi-de-tufos-pretos) mantidos em estabilidade social e isolados. 2007. 113f. **Dissertação** (Mestrado em Reprodução animal) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

SILVA, C. F.; DUARTE, F. S.; LIMA, T. C.; OLIVEIRA, C. L. Effects of social

isolation and enriched environment on behavior of adult Swiss mice do not require hippocampal neurogenesis. **Behavioural Brain Research**, 225: 85-90, 2011.

SILVA, L. O. P. O prejuízo comportamental, bioquímico e morfológico causado pela hypoxia-isquemia neonatal em ratos. 2007. 56f. **Tese** (Doutorado em Neurociências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Neurociências. Porto Alegre, 2007.

SILVA, M. A. N.; HELLMMEISTER, F. P.; ROSÁRIO, M. F.; MARTINS, E.; COELHO, A. A. D.; SAVINO, V. J. M.; SILVA, I. J. O.; MENTEN, J. F. M. Adaptação de linhagens de galinhas para corte ao sistema de criação semi-intensivo. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, 4(3): 219-225, 2002.

SILVA, M. A. N.; FILHO, P. H.; ROSÁRIO, M. F.; COELHO, A. A. D.; SAVINO, V. J. M.; GARCIA, A. A. F.; SILVA, I. J. O.; MENTEN, J. F. M. Influência do sistema de criação sobre o desempenho, a condição fisiológica e o comportamento de linhagens de frango para corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 32(1): 208-213, 2003.

SUGITA, N. Comparative studies on the growth of the cerebral cortex. **Journal of Comparative Neurology**, 29: 61-117, 1918.

TAVARES, A. L. A. Padrões de descarga neuronal na região de CA1 do hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal e de ratos com epilepsia induzida pela pilocarpina: um estudo comparativo. 2006. 205f. **Tese** (Doutorado em Neurociências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Neurociências. Porto Alegre, 2006.

TURNER, C. A.; LEWIS, M. H. Environmental enrichment: effects on stereotyped behavior and neurotrophin levels. **Physiology & Behavior**, 80: 259-266, 2003.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nature Neuroscience**, 2(3): 266-270, 1999.

VAN PRAAG, H. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature**, 414: 1030-4. 2002.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews Neuroscience**, 1: 191-198, 2000.

VIOLA, G. G. Enriquecimento ambiental modifica a morfologia dos astrócitos do hipocampo e a resposta comportamental no reconhecimento de objeto em camundongos. 2009. 79f. **Tese** (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pós-graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica. Porto Alegre, 2009.

VIOLA, G. G.; BOTTON, P. H.; MOREIRA, J.D.; ARDAIS, A.P.; OSES, J.P.; SOUZA, D.O., Influence of environmental enrichment on an object recognition task in CF1 mice. **Physiology & Behavior**, 99(1): 17-21, 2010.

VIOLA, G. G.; RODRIGUES, L.; AMÉRICO, J. C.; HANSEL, G.; VARGAS, R. S.; BIASIBETTI, R.; SWAROWSKY, A.; GOLÇALVES, C. A.; XAVIER, L. L.; ACHAVAL, M.; SOUZA, D. O.; AMARAL, O. B. Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. **Brain Research**, 1274: 47-54, 2009.

WOLFER, D. P.; LITVIN, O.; MORF, S.; NITSCH, R. M.; LIPP, H. P.; WÜRBEL, H. Laboratory animal welfare: Cage enrichment and mouse behaviour. **Nature**, 432: 821-822, 2004.

ZHAO, M.; MOMMA, S.; DELFANI, K.; CARLEN, M.; CASSIDY, R. M. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. **The Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100: 7925–30, 2003.

ZUPANC, G. K. H. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the brain of teleost fish. The **Journal of Physiology**, 102: 357-373, 2008.